KERAGAMAN GENETIK VARIETAS KEDELAI INTRODUKSI USDA BERDASARKAN MARKA SSR (*SIMPLE SEQUENCE REPEAT*) DAN MORFOLOGI

(Genetic Diversity of USDA introduction soybean varieties by using *simple sequence repeats* (SSR) markers and morphological)

Rizki Eka Putri
Innaka Ageng R /Puji Lestari
Jurusan Agroteknologi Fakultas Pertanian UMY

ABSTRACT

Soybean (*Glycine max* L. Merr.) Is the main commodity in Indonesia besides rice and maize. The increasing of national consumption of soybean becomes a challenge for soybean breeders. The success of breeding programs depends on availability of genetic diversity. The aim of this research was to identify the genetic diversity of USDA introduction soybean varieties by using *simple sequence repeats* (SSR) markers and morphological.

PCR analysis was scored as biner data and the collected data was analyzed using NTSYS and PowerMarker. The results showed that the overall marks used in this research as many as 15 markers are polymorphic. As many as 158 alleles with the size of 100-368 bp were identified by a range of 4-18 alleles per locus. The polymorphism level was 0.92 with the highest value 0.96 (SATT463), (SATT249) and (SATT063) while the lowest value 0.87 (SATT038). Result also showed the average of major allele frequency was14.29% with the lowest value of 3.84% (SATT249) and the highest value of 29.16% (SATT083). A total of 15 markers used in this study have a value of PIC> 0.5 could be used to detect genetic diversity of USDA introduction soybean. The average of genetic diversity index was 0,93. Cluster anlysis showed that 27 accessions of soybean were split in two groups coefficient 0.75. The first group consisted of 26 accessions, and the second groups consist of 1 accessions was D76-8070. The information of genetic diversity could be used as a preliminary basis for choosing crossing parents in soybean breeding of USDA introduction. Morphological analysis results indicating accession with the same morphological characteristics in the same quadrant would not necessarily have the same genetic because morphology influenced environmental factors

Keywords: Soybean (*Glycine max* L. Merr.), SSR, Genetic diversity, morphological

ABSTRAK

Kedelai (*Glycine max* L. Merr.) merupakan komoditas pangan utama di Indonesia selain padi dan jagung. Meningkatnya kebutuhan kedelai nasional menjadi tantangan bagi pemulia kedelai. Tersedianya keragaman genetika merupakan prasyarat keberhasilan program suatu varietas. Penelitian ini bertujuan mengidentifikasi keragaman genetika varietas kedelai introduksi USDA menggunakan marka *simple sequence repeats* (SSR) dan morfologi. Hasil analisis *polymerase chain reaction* (PCR) diberi skor sebagai data biner. Analisis data dilakukan menggunakan perangkat lunak NTSYS dan PowerMarker. Hasil penelitian menunjukkan bahwa keseluruhan marka yang digunkan dalam penelitian ini sebanyak 15 marka bersifat polimorfik. Sebanyak 158 alel berukuran antara 100-368 bp dengan kisaran 4-18 alel per lokus berhasil dideteksi. Nilai *polymorphic information content* (PIC) menunjukkan rerata sebesar 0,92 dengan nilai tertinggi 0,96 (SATT463), (SATT249) dan (SATT063) sedangkan nilai terendah 0,87 (SATT038). Rerata frekuensi alel utama adalah 14,29% dengan nilai terendah 3,84% (SATT249) dan nilai tertinggi 29,16% (SATT083). Sebanyak 15 marka yang digunakan dalam penelitian ini memiliki nilai PIC >0,5 yang dapat digunakan untuk mendeteksi keragaman genetika aksesi kedelai introduksi USDA. Keragaman aksesi kedelai tersebut cukup tinggi, seperti yang direfleksikan oleh nilai rerata diversitas gen, yaitu 0,93. Hasil analisis klaster menunjukkan bahwa dua puluh tujuh aksesi kedelai tersebut mengelompok menjadi dua kelompok utama pada koefisien 0,75. Kelompok pertama terdiri atas 26 aksesi, sedangkan kelompok kedua terdiri 1 aksesi yaitu D76-8070. Informasi keragaman genetika tersebut dapat menjadi dasar awal untuk pemilihan tetua persilangan dalam pemuliaan kedelai introduksi USDA. Hasil analisis morfologi menunjukkan aksesi dengan ciri morfologi yang sama pada kuadran yang sama belum tentu memiliki kesamaan genetic karena morfologi dipengaruhi faktor lingkungan.

Kata kunci: Kedelai (*Glycine max* L. Merr.), SSR, keragaman genetika, morfologi

PENDAHULUAN

Kedelai (*Glycine max* L. Merr.) merupakan komoditas pangan utama di Indonesia setelah komoditas padi dan jagung (Supandi, 2009). Meningkatnya kebutuhan penduduk berakibat pada meningkatnya kebutuhan kedelai dari tahun ke tahun (Kementrian Pertanian Direktorat Jendral Tanaman Pangan, 2016). Berdasarkan angka ramalan II BPS, kemampuan produksi dalam negeri saat ini rata-rata kebutuhan kedelai setiap tahunnya yaitu ± 2.2 juta ton biji kering. Pada tahun 2015, hanya memenuhi sebanyak 982.967 ton atau 44.68% terhadap kebutuhan dan sisanya sebesar 53,32% dipenuhi oleh impor (Kementrian Pertanian Direktorat Jendral Tanaman Pangan, 2015).

Adapun salah satu permasalahannya adalah produktivitas yang masih rendah sehingga terjadi impor kedelai. Peningkatan jumlah tersebut harus diikuti dengan penemuan varietas unggul agar kualitas kedelai bisa meningkat. Untuk mendukung program pembentukan varietas unggul, dibutuhkan sumber daya genetik yang memiliki keragaman untuk sifat yang diperbaiki. Kedelai introduksi salah satu alternatif bagi pemulia tanaman. Kedelai introduksi merupakan kedelai lokal luar negeri yang didatangkan ke dalam negeri untuk dirakit menjadi suatu varietas unggul

Selama ini, karakterisasi varietas di Indonesia lebih banyak dilakukan menggunakan pengamatan fenotipe yang dipengaruhi lingkungan sehingga sulit menentukan suatu karakter bersifat genetis. Marka molekuler dapat mengatasi masalah tersebut karena dapat langsung menandai gen tertentu sehingga dapat membantu para pemulia tanaman Salah satu marka molekuler yang memiliki tingkat polimorfisme tinggi ialah marka SSR (*Simple Sequence Repeats*). Kelebihan marka SSR adalah bersifat kodominan, mampu mendeteksi keragaman alel yang tinggi, berdasarkan teknik PCR. Identifikasi keragaman genetik menggunakan data morfologi juga telah digunakan pada tanaman Jarak Kepyar (Maryati *et al*., 2009) dan pada tanaman rambutan (Kuswandi *et al*., 2014). Penelitian ini bertujuan untuk mengidentifikasi keragaman genetik kedelai introduksi USDA menggunakan marka SSR.

BAHAN DAN METODE

Materi Penelitian

Bahan tanam yang digunakan dalam kegiatan penelitian ini terdiri atas 27 aksaesi kedelai introduksi USDA (Tabel 1) dan 15 pasang primer SSR yang didesain berbasis genom kedelai introduksi USDA (Tabel 2).

Tabel 1. Daftar Aksesi Kedelai Introduksi USDA

No.	Nama Aksesi	Nomor Aksesi	No.	Nama Aksesi	Nomor Aksesi
1	HS 93-4118	PI 614155	15	D76-8070	PI 536521
2	Strong	PI 614808	16	LS 201	PI 539866
3	Daksoy	PI 602896	17	D 92-6487	PI 573188
4	Chun Dou	PI 603723	18	NCBPMV-3	PI 593647
5	Bolivar	PI 612146	19	D 95-5246	PI 608357
6	LG 93-7054	PI 615554	20	Apex	PI 632401
7	LG 93 1255	PI 615553	21	HC 95-634	PI 632423
8	Parana	PI 628879	22	Desha	PI 633610
9	D 96-1217	PI 631157	23	LG 98-1445	PI 639284
10	CL0J0 095-4	PI 657626	24	Skylla	PI 639693
11	LG 01-5087-5	PI 667734	25	NC. Raleigh	PI 641156
12	NN	PI 84976-1	26	JTN-5303	PI 641937
13	Pace	PI 602496	27	S 00-9980-22	PI 643913
14	Tie-feng-8	PI 436684			

Daftar nama aksesi ini akan digunakan sebagai data sekunder untuk morfologi yang di ambil dari database web http://www.ars-grin.gov/

Data sekunder merupakan data yang diperoleh dari hasil studi pustaka dan penelusuran ke berbagai intansi terkait dengan penelitian (Sudibyo, 2011).

Data sekunder atau data *Principal Component Analysis* (PCA) yang diperoleh berupa data kualitatif sehingga perlu diubah terlebih dahulu menjadi data kuantitatif seperti yang terdapat pada keterangan dibawah tabel. Hal ini dikarenakan data sekunder perlu diolah menggunakan perangkat lunak XLSTAT yang bersifat data kuantitatif.

Tabel 2. Daftar Primer yang Digunakan dalam Penelitian

No	Nama Primer	*Forward*	*Reverse*	Posisi Kromosom	Motif SSR
1	SATT191	CGCGATCATGTCTCTG	GGGAGTTGGTGTTTTCTTGTG	18	(TAT)19
2	SATT009	CCAACTTGAAATTACTAGAGAAA	CTTACTAGCGTATTAACCCTT	3	(AAAT)3(AAT)13*
3	SATT030	AAAAAGTGAACCAAGCC	TCTTAAATCTTATGTTGATGC	13	(ATA)21
4	SATT063	AAATGATTAACAATGTTTATGAT	ACTTGCATCAGTTAATAACAA	14	(TAA)20
5	SATT045	TGGTTTCTACTTTCTATAATTATTT	ATGCCTCTCCCTCCT	15	(AAT)18
6	SATT197	CACTGCTTTTTCCCCTCTCT	AAGATACCCCCAACATTATTTGTAA	11	(ATT)20
7	SATT341	GCGGAGCTTACCAACATAAAAAAAACT	GCGGTCCAACATTGAGGCAAGAATAC	8	(AAT)17
8	SATT463	TTGGATCTCATATTCAAACTTTCAAG	CTGCAAATTTGATGCACATGTGTCTA	7	(AAT)13(GAT)17(AAT)19
9	SATT294	GCGGGTCAAATGCAAATTATTTTT	GCGCTCAGTGTGAAAGTTGTTTCTAT	4	(TAT)23
10	SATT147	CCATCCCTTCCTCCAAATAGAT	CTTCCACACCCTAGTTTAGTGACAA	1	(ATA)15
11	SATT114	GGGTTATCCTCCCCAATA	ATATGGGATGATAAGGTGAAA	13	(AAT)17
12	SATT308	GCGTTAAGGTTGGCAGGGTGGAAGTG	GCGCAGCTTTATACAAAAATCAACAA	7	(TTA)22
13	SATT038	GGGAATCTTTTTTCTTTCTATTAAGTT	GGGCATTGAAATGGTTTAGTCA	18	(ATA)17
14	SATT002	TGTGGGTAAAATAGATAAAAAT	TCATTTTGAATCGTTGAA	17	(TA)5tgtacgattaaaaatnaaata(AT)5
15	GMES1604	GTTGCAGGCACACTGGAGTA	CTCAGCCTTCTCCCTGTT		

Referensi : Cregan *et al.* 1999A An integrated genetic linkage map of the soybean Crop Sci. 39:1464-1490

(Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

Ekstraksi DNA

DNA diekstraksi menggunakan metode Doyle dan Doyle (1990) yang dimodifikasi berdasarkan Lestari (2016). Daun tanaman kedelai pertama muncul diambil sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung mikro 2 mL digerus sampai lumat menggunakan *blue pestle* yang telah diautoklaf diikuti dengan tambahan 800 µl buffer ekstraksi yang mengandung Tris-HCL 100 mM (pH 0,8), NaCl 1,4 M, EDTA 20 Mm (pH 8,0), cetyl trimethyl ammonium bromide (CTAB) 2% (w/v), *polyvinyl pryrrolidone* (PVP) 2% (w/v) dan natrium disulfit 0,38% (w/v). Sampel kemudian diinkubasi pada suhu 65°C di dalam *water bath* (*Thermo scientific* USA) selama 15 menit dan dihomogenkan dengan cara membolak-balik tabung setiap 5 menit. Selanjutnya ditambahkan 800 µl larutan kloroform : isoamil (24:1) ke dalam tabung mikro. Selanjutnya campuran disentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 10 menit pada suhu 20°C. Supernatan yang terbentuk lalu dipindahkan ke dalam tabung mikro 1,5 mL sebanyak 600 µl diikuti dengan penambahan 60 µl Natrium asetat 3 M (pH 5,2) dan 600 µl isopropanol. Campuran kemudian diinkubasi di dalam lemari pendingin bersuhu -20°C selama 1 jam. Setelah itu, campuran disentrifugasi kembali dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit pada suhu 20°C menggunakan alat eppendorf centrifuge 5810 R. Supernatan yang terbentuk kemudian dibuang sedangkan palet yang terbentuk dibilas menggunakan larutan etanol 70% sebanyak 500 µl untuk menghilangkan sisa garam. Selanjutnya, dilakukan sentrifugasi dengan kecepatan 12.000 rpm selama 5 menit pada suhu 20°C. Supernatan kemudian dibuang dan pelet yang telah bersih dikeringanginkan semalam. Pelet yang telah kering dilarutkan dalam 100 µl larutan TE (Tris 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) dan ditambahkan RNAse A (10 mg/ml) sebanyak 2 µl. Larutan DNA stok tersebut diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. DNA stok yang sudah jadi disimpan pada suhu -20°C hingga siap digunakan.

Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA kedelai USDA introduksi

Larutan DNA kedelai yang diperoleh dari hasil isolasi lalu diuji secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui tingkat kemurniannya. Uji kuantitatif dilakukan dengan menggunakan alat Nanodrop Spektrofotometer (Thermo Scientific, USA) sedangkan Uji kualitatif dilakukan dengan teknik elektroforesis untuk melihat adanya DNA

Amplifikasi DNA

Amplifikasi DNA dilakukan menggunakan 15 pasang primer SSR. Sampel yang digunakan sebanyak 27 aksesi. Masing-masing sampel diamplifikasi dalam total reaksi 10 µl yang mengandung Kapa 2G *fast ready mix* sebanyak 5 µl, primer *Forward* dan *Reverse* (konsentrasi 10 µM) masing-masing sebanyak 0,5 µl, ddH_2O steril 3 µl dan cetakan DNA hasil pengenceran 100 kali sebanyak 1 µl, sehingga total reaksi yang diperlukan dalam satu kali kegiatan PCR sebanyak 270 µl. Amplifikasi DNA menggunakan metode PCR.

Reaksi PCR dilakukan dalam mesin PCR *T1 Thermocycler* (Biometra Germany) dengan kondisi PCR sebagai berikut: pre denaturasi dilakukan pada suhu 95^0 C selama 5 menit, denaturasi awal dilakukan pada suhu 94^0 C, diikuti 34 siklus proses denaturasi selama 30 detik, tahap penempelan primer pada suhu 55^0

C selama 1 menit, dan tahap perpanjangan basa pada suhu 72°C selama 1 menit. Reaksi PCR diakhiri dengan tahap akhir perpanjangan basa pada suhu 60°C selama 15 menit. Waktu yang diperlukan dalam satu kali kegiatan PCR dilakukan selama 2 jam. Hasil PCR kemudian dielektroforesis menggunakan gel poliakrilamid 8%.

Analisis Data

1. Analisis Polimorfik

Analisis polimorfik dilakukan dengan menggunakan metode skoring terhadap pita DNA yang muncul pada hasil elektroforesis gel poliakrilamida 8%. Pita-pita yang terlihat pada hasil visualisasi dianggap sebagai satu alel. Pita-pita DNA yang memiliki laju migrasi yang sama dianggap sebagai lokus yang sama. Pada laju migrasi yang sama, setiap pita yang terlihat diberi skor 1, sedangkan pita yang tidak terlihat diberi skor 0, sehingga hasil dari skoring pita berupa data biner. Data hasil skoring dianalisis menggunakan program *sequential agglomerative hierarchial and nested* (SAHN)-UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic*) pada perangkat lunak NTSYS versi 2.1 (Rohlf, 2000). Hasil analisis disajikan dalam bentuk dendrogram. Selanjutnya, data hasil skoring juga dianalisis dengan menggunakan perangkat lunak PowerMarker 3.25 (Liu dan Muse, 2005) untuk mengetahui nilai frekuensi alel utama, diversitas genetika, dan *polymorphic information content* (PIC) yang dihasilkan oleh marka-marka yang digunakan dalam penelitian ini.

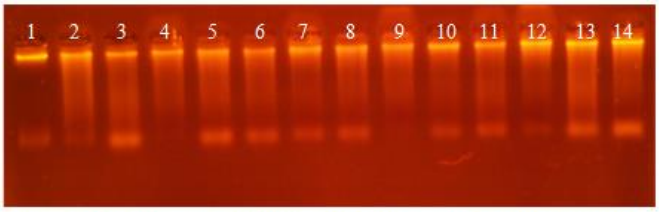
2. Analisis Morfologi

Data *Principal Component Analysis* (PCA) diolah menggunakan perangkat lunak XLSTAT. Setiap satu aksesi dianggap sebagai satu unit observasi. Karakter morfologi bersifat data kualitatif dikonversi terlebih dahulu menjadi data kuantitatif, sebagai contoh bunga kedelai berwarna ungu dapat diartikan data kualitatif. Lalu, dikonversi menggunakan angka misalnya 1, yang bersifat kuantitatif. Dengan demikian keseluruhan data akan menjadi data kuantitatif untuk mempermudah analisis. Hasil analisis disajikan dalam bentuk matriks korelasi Pearson dan gambar pengelompokkan aksesi pada empat kuadran.

HASIL DAN PEMBAHSAN

Hasil Uji Kuantitatif dan Kualitatif DNA

Uji kualitatif dilakukan dengan dipilih secara acak sebanyak 14 sampel dari 27 sampel yang digunakan karena dianggap mewakili keseluruhan sampel bahwa 14 sampel tersebut terdapat pita yang dibutuhkan. 14 sampel yang diuji kualitatif menggunakan teknik elektroforesis gel agarosa konsentrasi 1% pada tangki berisi buffer TAE 1x, dengan tegangan 90 Volt selama 45 menit. Hasil elektroforesis kemudian diamati di bawah UV *Transilluminator*. Hasil Uji kualitatif sampel DNA menggunakan gel agarose 1% disajikan pada gambar 1.



Gambar 1. Hasil uji kualitatif menggunakan gel agarose 1% (Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

Keterangan: 1-14 sampel kedelai introduksi USDA yang dipilih secara acak untuk uji kualitatif .
Sampel 1 aksesi Strong; sampel 2 aksesi Bolivar; sampel 3 aksesi Parana; sampel 4 aksesi NN; sampel 5 aksesi LS201; sampel 6 aksesi Chun Dou; sampel 7 aksesi Apex; sampel 8 aksesi Desha; sampel 9 aksessi D 96-1217; sampel 10 aksesi Skylla; sampel 11 aksesi JTN-5303; sampel 12 aksesi Pace; sampel 13 aksesi LG98-1445; sampel 14 aksesi CL0J0 095-4

Berdasarakan Gambar 1 menunjukkan hasil uji kualitas DNA secara kualitatif. Secara umum sampel yang digunakan dalam uji kualitatif menghasilkan pita-pita DNA. Namun demikian, pita-pita DNA hasil elektroforesis yang diperoleh terdapat *smear*. *Smear* pita DNA tersebut diduga disebabkan oleh pemipetan DNA berulang-ulang sehingga DNA akan terpotong. Hal ini mengakibatkan terjadinya *smear* pada pita-pita yang diuji (Solihah, 2014). Larutan DNA dapat digunakan sebagai sampel cetakan PCR apabila DNA memiliki nilai kemurnian. Nilai kemurnian DNA dapat ditentukan menggunakan perbandingan Optical Density (OD) larutan pada berbagai macam gelombang dengan menggunakan spektofotometer. Tingkat kemurnian DNA dikatakan baik jika nilai rasio Optical Density (OD) 260/280 nm yang diperoleh antara 1.8-2.0 (Sambrook *et al.*, 1989). Uji kemurnian DNA menggunakan alat Nanodrop Spektofotometer dengan rasio OD 260/280 nm disajikan pada tabel 3.

Tabel 3. Hasil Uji Kemurnian DNA

Sampel No.	Nama Aksesi	Konsentrasi (ng/µl)	A260/A80
1	HS 93-4118	1408,7	2,1
2	Strong	902,3	2,1
3	Daksoy	1197,0	2,1
4	Chun Dou	934,0	2,1
5	Bolivar	453,8	2,1
6	LG 93-7054	656,0	2,1
7	LG 93 1255	933,0	2,1
8	Parana	1342,2	2,1
9	D 96-1217	1447,7	2,1
10	CL0J0 095-4	1943,7	2,1
11	LG 01-5087-5	1441,8	2,1
12	NN	1419,9	2,1
13	Pace	1046,2	2,1
14	Tie-feng-8	613,7	2,1
15	D76-8070	2524,3	2,1
16	LS 201	815,1	2,1
17	D 92-6487	496,7	2,1
18	NCBPMV-3	1310,4	2,1
19	D 95-5246	1136,4	2,1
20	Apex	1483,0	2,1
21	HC 95-634	655,6	2,1
22	Desha	967,5	2,1
23	LG 98-1445	782,9	2,1
24	Skylla	1196,4	2,1
25	NC. Raleigh	982,5	2,1
26	JTN-5303	1040,9	2,1
27	S 00-9980-22	1218,8	2,1

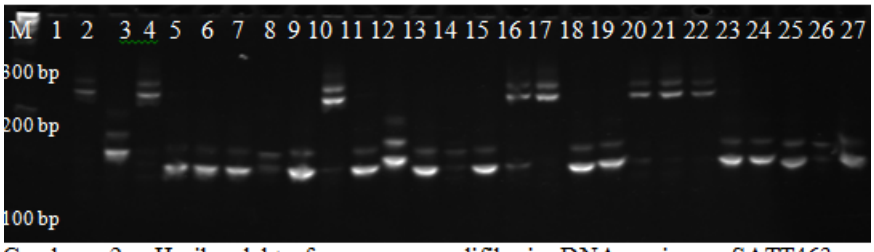
(Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

Berdasarkan data (Tabel 3) menunjukkan hasil pengukuran kualitas DNA secara kuantitatif yang meliputi konsentrasi dan kemurnian DNA. Dari seluruh sampel yang dihitung konsentrasi dan kemurniannya, secara umum konsentrasi DNA hasil isolasi memiliki konsentrasi yang relatif besar dan tidak seragam. Pengukuran kuantitas DNA dengan menggunakan menggunakan alat spektofotometer. hasil kemurnian DNA (Tabel 3) menunjukkan keseluruhan sampel yang diuji memiliki nilai rasio 2,1. Sementara nilai kemurnian DNA

berkisar antara 1.8-2.0 (Sambrook *et al.*, 1989). Nilai kemurnian DNA yang tinggi diduga karena adanya sisa-sisa etanol pada saat pengeringan yang tidak sempurna dan adanya sisa kandungan metabolit sekunder pada organ tanaman yang diekstrak.

Analisis Polimorfisme

Analisis polimorfisme dilakukan untuk menemukan keragaman genetik dari satu varietas dengan varietas yang lain. Pada penelitian ini telah disurvei tingkat polimorfisme 27 varietas kedelai introduksi USDA menggunakan 15 marka SSR. Hasil amplifikasi DNA berukuran antara 100-500 pasang basa (bp) (Gambar 2). Ukuran alel yang diperoleh pada penelitian ini memiliki kisaran 100 bp hingga 368 bp. Pita-pita yang ukurannya terletak di atas 500 bp tidak diikutkan dalam analisis selanjutnya karena target dari marka yang digunakan bukanlah pita-pita tersebut. Adanya pita yang terletak di atas ukuran target diduga akibat tipe kromosom kedelai yang somatik (2n = 40) sehingga pola pita yang dihasilkan menjadi lebih banyak. Salah satu hasil amplifikasi DNA menggunakan primer SATT436 pada gel poliakrilamid 8% disajikan pada gambar 2.



Gambar 2. Hasil elektroforegram amplifikasi DNA primer SATT463 (Dokumentasi pribadi, 2017)

Keterangan: M=marker 100 bp, sampel 1-27 merupakan sampel kedelai introduksi USDA

Polimorfisme yang terjadi dari analisis ditunjukkan dengan terbentuknya pita DNA. Adanya polimorfisme ini menggambarkan tingkat keragaman genetik yang dikarakterisasi. Semakin tinggi tingkat polimorfisme maka tingkat keragaman genetik suatu varietas juga akan semakin tinggi.

Tabel 4. Jumlah Alel, Frekuensi Alel Utama, Diversitas Gen, dan Tingkat Polimorfisme (PIC) yang dihasilkan dari Dua Puluh Tujuh Varietas Kedelai Introduksi USDA

Marka	Frekuensi alel utama	Diversitas gen	PIC	Jumlah alel	Kisaran ukuran alel (bp)
SATT463	0.06	**0.97**	**0.96**	17	124-254
SATT249	**0.04**	0.96	**0.96**	14	245-341
SATT191	0.09	0.95	0.95	12	199-254
SATT147	0.13	0.93	0.92	9	172-237
SATT431	0.09	0.95	0.94	9	138-190
SATT308	0.17	0.91	0.91	10	143-204
SATT197	0.16	0.92	0.92	9	195-247
SATT114	0.15	0.95	0.94	12	146-248
SATT063	0.09	0.96	0.96	18	124-276
SATT045	0.16	0.91	0.90	7	155-279
SATT038	**0.29**	**0.88**	**0.87**	12	100-188
SATT030	0.17	0.91	0.90	8	170-213
SATT009	0.17	0.93	0.93	13	160-275
SATT002	0.19	0.89	0.88	4	202-219
GMES1604	0.19	**0.88**	**0.87**	4	352-368
Jumlah				158	
Rata-rata	**0.14**	**0.93**	**0.92**	10.53	

(Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

Activate Windows
Go to Settings to activate W

Hasil analisis polimorfisme (Tabel 4) menunjukkan bahwa keragaman genetik yang tinggi dapat dideteksi dari 27 aksesi kedelai introduksi USDA menggunakan 15 marka SSR (Tabel 4) Sebanyak 158 alel terdeteksi dapat diidentifikasi dengan rerata jumlah alel dari marka SSR hasil amplifikasi sebanyak 10,53 alel per marka dengan kisaran antara 4-18 alel per lokus. Jumlah alel yang terdeteksi pada penelitian ini lebih tinggi dibandingkan dengan penelitian sebelumnya Lestari dkk (2016) yang menganalisis 29 varietas kedelai lokal Indonesia, terdeteksi 50 alel dengan kisaran 4-9 alel per lokus SSR yang digunakan. Namun demikian, rerata jumlah alel yang diperoleh pada penelitian ini lebih rendah dari pada penelitian Santoso *et al*. (2006) yang menganalisis 96 aksesi tanaman kedelai lokal dan beberapa varietas introduksi koleksi BB-Biogen, dan berhasil mendeteksi 11,6 alel per marka berukuran 79-300 bp dengan kisaran 7-19 alel per lokus SSR.

Rerata frekuensi alel utama yang dihasilkan adalah 14,29% dengan nilai terendah 3,84%% (SATT249) dan nilai tertinggi 29,16% (SATT038).

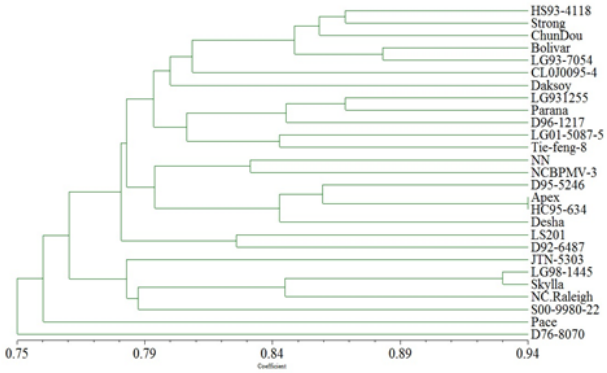
Nilai diversitas gen yang tertinggi ditunjukkan oleh marka SATT463, yaitu 0,97, sedangkan nilai diversitas terendah ditunjukkan oleh dua marka yaitu SATT038 dan GMES1604 sebesar 0,88. Rerata nilai diversitas gen adalah 0,93. Tingginya rata-rata nilai diversitas gen menunjukkan bahwa lokus SSR yang digunakan dapat membedakan antar varietas yang digunakan (Surti, 2011).

Nilai PIC (Tabel 5) menunjukkan rerata yang cukup tinggi yaitu 0,92 dengan kisaran antara 0,87 sampai 0,96. Nilai PIC terendah (0,87) dihasilkan oleh marka SATT038 dan GMES1604, sedangkan nilai tertinggi (0,96) dihasilkan oleh marka SATT463, SATT249 dan SATT063. Sementara itu, penelitian Lestari dkk (2016) menghasilkan PIC dengan kisaran antara 0,38 hingga 0,74. Tingkat informatif marka ditentukan dengan nilai PIC. Semakin tinggi nilai PIC yang diperoleh, maka semakin informatif primer tersebut dalam membedakan individu antar genotipe dalam populasi. Sehingga nilai PIC yang dilakukan dalam penelitian lebih informatif dibandingkan penelitian Lestari dkk (2016).

DeWoody *et al.* (1995) menyatakan bahwa marka molekuler yang memiliki nilai PIC >0,5 merupakan marka yang efisien dalam mendiskriminasi genotipe-genotipe dan sangat berguna dalam mendeteksi tingkat polimorfisme pada lokus tersebut. Berdasarkan nilai PIC yang diperoleh, sebanyak 15 marka yang digunakan dalam penelitian ini memiliki nilai PIC >0,5. Hal ini menunjukkan bahwa keseluruhan marka yang digunakan dapat diaplikasi lebih lanjut dalam mendukung program pemuliaan tanaman kedelai.

Analisis Filogeni

Berdasarkan analisis klaster dengan menggunakan perangkat NTSYS, diperoleh hasil dendrogram yang menunjukkan bahwa dua puluh tujuh kedelai introduksi USDA menghasilkan dua klaster utama pada koefisien 0,75 yang disajikan pada gambar 3



Gambar 3. Hasil dendrogram 27 kedelai introduksi USDA (Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

Hasil dendrogram 27 kedelai introduksi USDA pada Gambar 6. menunjukkan bahwa kedelai introduksi USDA yang digunakan menghasilkan dua klaster utama pada koefisien 0,75. Klaster pertama terdiri atas 26 aksesi, sedangkan klaster kedua terdiri atas 1 aksesi, yaitu D76-8070. Dua klaster utama berdasarkan total marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini menggambarkan kekerabatan yang jauh antara kedua grup aksesi kedelai introduksi USDA, namun secara genetis aksesi yang berada dalam klaster yang sama lebih dekat kekerabatannya. Hal ini dibuktikan dari nilai koefisien pada hasil dendrogram. Semakin tinggi nilai koefisien pada hasil dendrogram, maka semakin dekat pula jarak genetik aksesi kedelai introduksi.

Marka SSR yang digunakan dalam penelitian ini mampu mengelompokkan dua aksesi introduksi yang berasal dari Negara bagian yang sama yaitu Ohio, kedua aksesi ini antara lain Apex dan HC95-634. Kedua aksesi tersebut berada pada subkelompok yang sama dengan dendrogram yang memiliki nilai matriks kesamaan genetik tertinggi yaitu 0,94 sebagaimana disajikan pada tabel 6.

Tabel 5. Nilai Matriks Kesamaan Genetika 27 Kedelai Introduksi USDA

Varietas	HS93-4118	Strong	Daksoy	ChunDou	Bolivar	LG93-7054	LG931255	Parana	D96-1217	CL0J0095-4	LG01-5087-5	NN	Pace	Tie-feng-8	D76-8070	LS201	D92-6487	NCBPMV-3	D95-5246	Apex	HC95-634	Desha	LG98-1445	Skylla	NC.Raleigh	JTN-5303	S00-9980-22
HS93-4118	1.00																										
Strong	0.87	1.00																									
Daksoy	0.87	0.81	1.00																								
ChunDou	0.87	0.86	0.78	1.00																							
Bolivar	0.84	0.85	0.78	0.86	1.00																						
LG93-7054	0.86	0.85	0.81	0.85	0.88	1.00																					
LG931255	0.85	0.80	0.81	0.78	0.85	0.83	1.00																				
Parana	0.81	0.82	0.81	0.79	0.81	0.83	0.87	1.00																			
D96-1217	0.79	0.79	0.79	0.79	0.81	0.80	0.84	0.85	1.00																		
CL0J0095-4	0.83	0.81	0.77	0.82	0.79	0.80	0.79	0.79	0.78	1.00																	
LG01-5087-5	0.76	0.78	0.75	0.76	0.82	0.80	0.83	0.79	0.77	0.79	1.00																
NN	0.78	0.77	0.77	0.75	0.78	0.77	0.79	0.77	0.74	0.77	0.79	1.00															
Pace	0.75	0.74	0.75	0.77	0.80	0.78	0.78	0.79	0.77	0.78	0.80	0.73	1.00														
Tie-feng-8	0.79	0.78	0.77	0.78	0.79	0.79	0.83	0.85	0.79	0.81	0.85	0.76	0.79	1.00													
D76-8070	0.77	0.77	0.76	0.74	0.77	0.77	0.73	0.73	**0.68**	0.76	0.75	0.78	0.72	0.73	1.00												
LS201	0.83	0.82	0.79	0.80	0.77	0.79	0.78	0.84	0.77	0.74	0.78	0.78	0.74	0.81	0.74	1.00											
D92-6487	0.80	0.79	0.79	0.76	0.77	0.81	0.76	0.78	0.75	0.76	0.77	0.75	0.71	0.80	0.77	0.83	1.00										
NCBPMV-3	0.78	0.81	0.75	0.78	0.83	0.81	0.78	0.83	0.77	0.80	0.80	0.83	0.77	0.79	0.78	0.79	0.77	1.00									
D95-5246	0.80	0.81	0.76	0.79	0.81	0.78	0.79	0.82	0.77	0.81	0.83	0.80	0.78	0.84	0.74	0.82	0.77	0.83	1.00								
Apex	0.81	0.84	0.77	0.81	0.80	0.81	0.81	0.82	0.81	0.79	0.81	0.79	0.76	0.84	0.76	0.84	0.80	0.84	0.87	1.00							
HC95-634	0.80	0.83	0.75	0.80	0.78	0.78	0.79	0.80	0.79	0.78	0.79	0.78	0.76	0.83	0.72	0.80	0.78	0.84	0.86	**0.94**	1.00						
Desha	0.75	0.80	0.71	0.79	0.76	0.75	0.71	0.74	0.73	0.75	0.76	0.73	0.75	0.78	0.74	0.77	0.75	0.78	0.82	0.86	0.86	1.00					
LG98-1445	0.79	0.82	0.75	0.77	0.81	0.80	0.75	0.75	0.73	0.77	0.74	0.77	0.73	0.75	0.73	0.77	0.77	0.81	0.79	0.80	0.79	0.77	1.00				
Skylla	0.78	0.80	0.74	0.75	0.80	0.77	0.74	0.73	0.72	0.74	0.73	0.76	0.69	0.72	0.70	0.74	0.74	0.79	0.80	0.82	0.80	0.77	0.93	1.00			
NC.Raleigh	0.76	0.77	0.74	0.74	0.79	0.74	0.74	0.73	0.69	0.75	0.72	0.73	0.73	0.72	0.76	0.73	0.73	0.77	0.75	0.78	0.77	0.76	0.85	0.85	1.00		
JTN-5303	0.78	0.78	0.75	0.75	0.81	0.79	0.77	0.73	0.72	0.71	0.80	0.76	0.70	0.76	0.74	0.75	0.78	0.74	0.80	0.81	0.79	0.77	0.78	0.82	0.76	1.00	
S00-9980-22	0.78	0.77	0.77	0.78	0.79	0.80	0.78	0.76	0.73	0.75	0.77	0.78	0.74	0.75	0.74	0.73	0.79	0.80	0.79	0.79	0.80	0.75	0.80	0.81	0.77	0.78	1.00

(Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

Berdasarkan matriks kesamaan genetika (Tabel 5) terdapat dua aksesi kedelai introduksi USDA, yaitu aksesi D76-8070 dan aksesi D96-1217 yang memiliki nilai kesamaan genetik paling rendah, sebesar 0,68. Menurut Sukartini (2007), aksesi-aksesi yang jarak genetiknya jauh berpotensi untuk digunakan sebagai tetua pada program pemuliaan tanaman.

Analisis Morfologi

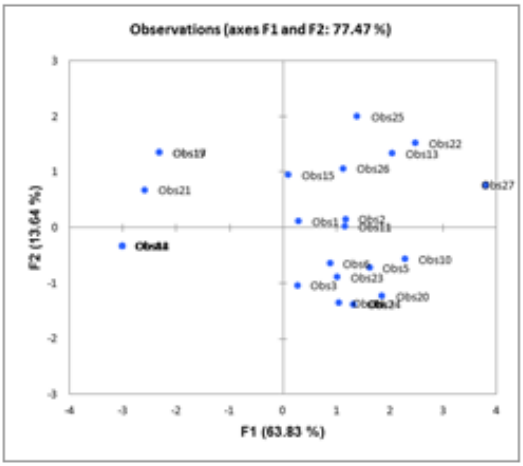
Hasil analisis morfologi berdasarkan data sekunder (Tabel 1) bersifat kualitatif. Ada 7 variabel yang dianalisis berdasarkan karakter morfologi yaitu; bunga, polong, biji, hilum, pertumbuhan, pubescence, dan maturity group. Karakter morfologi tersebut dianalisis untuk mengetahui keterkaitan variabel satu dengan yang lain. Hasil analisis disajikan dalam bentuk matriks korelasi Pearson dan gambar pengelompokkan aksesi pada empat kuadran. Hasil analisis matriks korelasi Pearson disajikan pada tabel 6.

Tabel 6. Nilai Matriks Korelasi Pearson

Variabel	Bunga	Polong	Biji	Hilum	Pertumbuhan	Pubescence	Maturity Group
Bunga	**1**	**0.739**	**0.784**	**0.458**	**0.495**	**0.890**	0.269
Polong	**0.739**	**1**	**0.694**	**0.637**	**0.401**	**0.754**	**0.422**
Biji	**0.784**	**0.694**	**1**	**0.442**	**0.727**	**0.713**	**0.414**
Hilum	**0.458**	**0.637**	**0.442**	**1**	**0.484**	**0.608**	**0.585**
Pertumbuhan	**0.495**	**0.401**	**0.727**	**0.484**	**1**	**0.532**	**0.455**
Pubescence	**0.890**	**0.754**	**0.713**	**0.608**	**0.532**	**1**	**0.451**
Maturity Group	0.269	**0.422**	**0.414**	**0.585**	**0.455**	**0.451**	**1**

Keterangan : Angka yang dicetak tebal memiliki korelasi positif dengan tingkat signifikansi alpha = 0,05

Berdasarkan nilai matriks korelasi Pearson pada (Tabel 6), keseluruhan variabel memiliki korelasi positif antar variabel satu dengan yang lain kecuali dua variabel yaitu bunga dan maturity group yang tidak berkorelasi positif. Hal ini dibuktikan pada (Tabel 6) variabel bunga dan maturity group memiliki nilai matriks 0,269 kurang dari 0,05 yang menunjukkan bahwa tidak adanya keterkaitan antar variabel. Semakin tinggi nilai matriks korelasi pearson, maka semakin dekat pula keterkaitan antar variabel yang memiliki korelasi positif. Sebanyak 27 aksesi kedelai introduksi USDA dikelompokkan pada empat kuadran. Setiap satu aksesi dianggap sebagai satu unit observasi (Tabel 1). Hasil pengelompokan 27 aksesi disajikan pada gambar 4.



Gambar 4. Pengelompokan 27 aksesi kedelai introduksi USDA (Dokumentasi BB-Biogen, 2017)

Hasil pengelompokan 27 aksesi terbagi menjadi 4 kuadran (Gambar 4). Observasi 1 (HS 93-4118) dengan Observasi 15 (D76-8070) berkumpul dalam satu kuadran yang sama menunjukkan bahwa observasi yang berkumpul dalam satu kuadran sama memiliki kesamaan karakter morfologi baik segi warna bunga, polong, biji, hilum, tipe pertumbuhan, pubescence, maturity group maupun Negara bagian

yang sama. Banyaknya aksesi yang berkumpul dalam satu kuadran sama dapat dijadikan referensi sumber tetua dalam persilangan. Namun berdasarkan hasil genetik analisis filogeni (Gambar 3) menunjukkan Observasi 1 (HS 93-4118) dengan Observasi 15 (D76-8070) memiliki tingkat kekerabatan jauh karena berada dalam klaster berbeda. Hal ini menunjukkan bahwa faktor lingkungan mempengaruhi karakter morfologi, sehingga uji genetik sangat diperlukan dalam persilangan varietas.

KESIMPULAN

1. Marka SSR (*Simple Sequence Repeats*) berhasil mengidenifikasi keragaman genetik bersifat polimorfik dari 27 aksesi kedelai introduksi USDA. Aksesi D76-8070 memiliki kekerabatan jauh di bandingkan dengan aksesi kedelai lainnya. Sehingga aksesi D76-8070 dapat dijadikan tetua dalam pemuliaan tanaman kedelai.
2. Hasil analisis morfologi menunjukkan aksesi dengan ciri morfologi yang sama pada kuadran yang sama belum tentu memiliki kesamaan genetik karena morfologi dipengaruhi faktor lingkungan. Hal ini menunjukkan bahwa faktor lingkungan mempengaruhi karakter morfologi, sehingga uji genetik sangat diperlukan dalam persilangan varietas.

DAFTAR PUSTAKA

BPS. 2015. Produksi padi, jagung dan kedelai meningkat. Dapat diakses *https://www.bps.go.id/Brs/view/id/1157* tanggal 11 Februari 2017

DeWoody, J.A., R.L. Honeycutt, and L.C. Skow. 1995. Microsatellitemarkers in white-tailed deer. J. Hered. 86:317-319

Kementrian Pertanian Direktorat Jendral Tanaman Pangan. 2015. Jurnal Pengelolaan Produksi Kedelai dan Bantuan Pemerintah Tahun Anggaran 2016

Kementrian Pertanian Direktorat Jendral Tanaman Pangan. 2016. Data Produksi Padi, Jagung Kedelai 2015 Naik dibandingkan Tahun 2014. Dapat diakses *http://tanamanpangan.pertanian.go.id/berita/123.* tanggal 11 Februari 2017

Kuswandi, Sobir dan Suwarno. 2014. Keragaman Genetik Plasma Nutfah Rambutan di Indonesia Berdasarkan Karakter Morfologi. *J. Hort. 24(2):289-298, 2014*

Lestari, P., A. Risliawati., Dwinita W. Utamia, Nurul Hidayatun, Tri Joko Santoso dan Chaerani. 2016. Pengembangan Identitas Spesifik Berbasis Marka SSR pada 29 Varietas Kedelai Lokal Indonesia. Jurnal Biologi Indonesia 12(2): 219-229.

Liu, K. and S.V. Muse. 2005. PowerMarker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics Research Center, North California State University, Raleigh.

Maryati, S., Mamen, S., Tatiek, S. 2009. Identifikasi Keragaman Genetik Menggunakan Marka Morfologi dan Marka Molekuler Menuju Perakitan Varietas Unggul Jarak Keoyar (*Ricinus communis).*

Rohlf FJ. 2000. NTSY*Spc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1 User Guide*. New York(US): Exter Publications

Sambrook J, Fritschi EF and Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratorymanual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Santoso, Dwinita W. Utami, dan Endang M. Septiningsih. 2006. Analisis Sidik Jari DNA Plasma Nutfah Kedelai Menggunakan Markah SSR. Jurnal AgroBiogen 2(1):1-7.

Solihah, SM. 2014. Ekstraksi DNA analisis. Bogor Agricultural University

Sudibyo. 2011. Zonasi Konservasi Mangrove di Kawasan Pesisir Pantai Kabupaten Pati. Skripsi Program Agroteknologi Fakultas PERTANIAN Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. 101 halaman.

Surti Kurniasih, Rubiyo, Asep, S., Agus, P., dan Sudarsono. 2011. Analisis Keragaman Genetik Plasma Nutfah Kakao (*Theobroma cacao* L.) Berdasarkan Marka SSR. Jurnal Littri 17(4), Desember 2011. Hlm. 156-162.